



Universidad de Zaragoza

FACULTAD DE CIENCIAS

GRADO DE BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

“Optimización de una Técnica Espectrofotométrica de Medida de Ecotoxicidad en Algas por Microtitulaciones”

“Optimization of an Algae Ecotoxicity Measuring Spectrophotometric Technique by Microtitulations”

Carmen Menacho Miralles

Dirigido por

Carlos Lafuente, Universidad de Zaragoza,

Beatriz Giner, Universidad San Jorge

Zaragoza, Junio de 2016

ÍNDICE

1. Resumen.....	Pág. 4
Abstract.....	Pág. 4
2. Introducción.....	Pág. 4
3. Objetivos.....	Pág. 7
3.1 Objetivo principal.....	Pág. 7
3.2 Objetivos específicos	Pág. 7
4. Materiales y Métodos.....	Pág. 7
4.1 Especie.....	Pág. 7
4.2 Preaparación del Medio de Cultivo.....	Pág. 7
4.3 Desinmovilización de las algas.....	Pág. 7
4.4 Preparación del inóculo de algas concentrado.....	Pág. 7
4.5 Preparación de las diluciones seriadas.....	Pág. 8
4.6 Transferencia de las soluciones a testar.....	Pág. 8
4.7 Incubación.....	Pág. 9
4.8 Adquisición de resultados.....	Pág. 9
4.9 Tratamiento de datos.....	Pág. 9
4.10 Variables.....	Pág. 10
5. Resultados y Discusión.....	Pág. 11
5.1 Agitación durante el ensayo.....	Pág. 11
5.2 Resuspensión.....	Pág. 11
5.3 Micropipetas.....	Pág. 12
5.4 Concentración de algas.....	Pág. 13
5.5 Orden de inoculación.....	Pág. 13
5.6 Evaporación de pocillos y condensación en la tapa.....	Pág. 14

5.7 Posición en la incubación.....	Pág. 15
5.8 Controles.....	Pág. 16
5.9 Ensayos reproducibles.....	Pág. 17
5.10 Problemas en la disolución de los fármacos.....	Pág. 21
6. Conclusiones.....	Pág. 21
Conclusions	Pág. 23
Bibliografía.....	Pág. 25

1. RESUMEN

Ante la problemática de la gran presencia de fármacos tanto de uso humano como veterinario en el medio ambiente, surge la necesidad de evaluar el riesgo ambiental de estos compuestos en la cadena trófica. Para ello se requiere el desarrollo de estudios ecotoxicológicos en diferentes especies bioindicadoras de la misma, como son las algas, las daphnias y los peces.

Se ha llevado a cabo la puesta a punto, mediante microtitulaciones, de una técnica espectrofotométrica para medir la inhibición de crecimiento en algas *Selenastrum capricornutum* ante la presencia de medicamentos en el medio acuático con el objetivo de minimizar gastos en material y tiempo.

Los resultados preliminares de este estudio permiten obtener datos de ecotoxicidad de fármacos con fiabilidad y se ha demostrado que la modificación de la técnica es reproducible.

ABSTRACT

Due to the the large presence of drugs for both human and veterinary use in the environment, the need to evaluate the environmental risk of these compounds into the food chain is coming up. This assessment requires the development of ecotoxicological studies on different bioindicator species, such as algae, daphnia and fishes.

It was carried out, by microtitulations, the tuning of a spectrophotometric technique for measuring *Selenastrum capricornutum* algae growth inhibition in the presence of drugs in the aquatic environment in order to minimize material costs and time.

Preliminary results of this study allowed us to obtain reliable drug ecotoxicity data and reproductibility of the technique was successfully proved.

2. INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas se han estado utilizando antibióticos de forma masiva, tanto para el uso humano como el veterinario y acuícola, siendo utilizados en estos dos últimos casos no sólo como tratamiento o prevención de enfermedades, sino también para promover su crecimiento [1-3]. Los fármacos una vez metabolizados por el cuerpo bien humano o animal, son excretados como compuesto original o metabolitos del mismo principalmente por la orina, al tratarse en su mayoría de medicamentos hidrosolubles, o bien por las heces en caso de no serlo [4].

Por tanto y dependiendo de las propiedades fisicoquímicas del fármaco, éstos puedan suponer un problema en los ecosistemas, principalmente acuático pero también terrestre, ya que son liberados al medio ambiente a través de los eflujos de las plantas de tratamiento de aguas residuales y mediante el empleo de abonos y fertilizantes en campos, habiéndose evidenciado su presencia en un amplio rango de muestras de aguas superficiales y subterráneas, las cuales son utilizadas para el suministro de agua potable [1, 4-6].

Hasta la fecha se ha centrado el interés en los posibles efectos adversos de los medicamentos sobre el consumidor, mediante estudios de seguridad y toxicidad, y no se han considerado aquellos relativos a la eliminación o persistencia de los mismos [1, 6]. Teniendo en cuenta que los fármacos están especialmente diseñados para penetrar biomembranas y persistir a la biodegradación, así como para afectar a sistemas biológicos, existiendo una gran proporción que actúan como disruptores endocrinos, no es de extrañar que la liberación de éstos al medio ambiente sea potencialmente peligrosa/perjudicial para las distintas especies presentes en los ecosistemas [1, 5]. Así aconteció en el caso del buitre de espalda blanca oriental (*Gyps bengalensis*), autóctono de la India, que sufrió un descenso poblacional a causa de enfermedades renales provocadas por el antiinflamatorio diclofenac, ingerido vía alimento [6].

Cabe resaltar que los fármacos son utilizados en cantidades similares a las de agroquímicos o microcontaminantes orgánicos ambientalmente dañinos y sin embargo no son sometidos al mismo nivel de análisis del impacto ambiental. Durante décadas se han emitido al ecosistema sin restricción y, debido a su larga vida media y a su liberación como mezclas complejas, se desconoce la extensión de su exposición así como las proporciones de los efectos consecuentes [1, 2, 5].

Adicionalmente, su uso y consumo humano está aumentando debido al descubrimiento de nuevos medicamentos, la expansión y envejecimiento de la población, la expiración de patentes y el aumento de enfermedades crónicas [6].

Por todo ello y dado el desconocimiento del impacto ambiental actual de los fármacos que se liberan y los ya liberados al ecosistema, es necesario establecer evaluaciones del riesgo ambiental [1].

Estas evaluaciones permiten identificar la peligrosidad potencial de una sustancia en función de su toxicidad para los organismos del medio, su capacidad de bioacumulación y su degradabilidad. Fundamentalmente este análisis se basa en datos de ecotoxicidad que han de obtenerse considerando los diferentes niveles de la cadena trófica, siendo el medio acuático el único para el cual se disponen actualmente de criterios formalizados para su estudio en la UE.

El análisis se desarrolla habitualmente mediante bioensayos a corto plazo, en los que se cuantifica el efecto de la sustancia de interés mediante la obtención de la concentración efectiva media (EC_{50}), a la cual se inhibe la función vital del 50% de los individuos del ensayo [7]. Se realiza el estudio de ecotoxicidad de la molécula en tres especies bioindicadoras estándar: algas, crustáceos (*Daphnia magna*) y peces, según las directrices de los protocolos establecidos por la OECD (Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico) reflejados en la Tabla 2.1 [7, 8].

Especie	Efecto a medir	Horas de exposición	Protocolo OECD
Peces	Letalidad	96	203
Daphnia magna	Inmovilidad	48	202
Algas	Inhibición del crecimiento	72	201

Tabla 2.1: Ensayos de toxicidad aguda en especies bioindicadoras del medio acuático.

En nuestro caso nos centramos en desarrollar ensayos en microalgas *Selenastrum capricornutum* según la norma OECD 201 [9]. Se trata de un alga verde unicelular, con forma de media luna, que no suele aglutinarse y es incapaz de formar cadenas, lo cual facilita su recuento en caso necesario. Es común en aguas dulces y fácilmente disponible y cultivada en el laboratorio.

Los bioensayos realizados sobre *S. capricornutum* se basaron en su exposición durante 72 horas a fármacos en diferentes concentraciones, causando inhibición de su tasa de crecimiento, la cual se puede medir espectrofotométricamente y gracias a la clorofila, a la longitud de onda de 670 nm. Comparando los resultados obtenidos con el crecimiento normal de muestras control, se calculan las concentraciones efectivas medias (EC_{50}) [10-12].

Los inconvenientes de este ensayo residen en el requerimiento de grandes volúmenes, la necesidad de medir una a una las celdas de cultivo mediante espectrofotómetro UV, lo cual resulta oneroso y el elevado coste tanto en tiempo como en material.

Es por esto que se ha decidido llevar a cabo la puesta a punto de un protocolo de medición de ecotoxicidad en algas *S. capricornutum* mediante microtitulaciones, utilizando volúmenes en el rango de μ l y no ml, y como soportes, placas de 96 pocillos en vez de celdas de 10 cm. De esta manera no sólo se minimizará en volúmenes y por ello en costes, sino también en tiempo al poder medir directamente a través de un lector de placas.

Para ello se eligieron cuatro fármacos de EC_{50} conocida sobre estas microalgas, a saber: ácido oxolínico (AO), oxitetraciclina (OT), sulfadiazina (SD) y trimetoprim (TR) [13]; la estructura química y propiedades fisicoquímicas de los mismos, se muestran en la Figura 2.1 [2]. Estos antibióticos fueron puestos en contacto con las algas durante el desarrollo de los bioensayos, en los cuales se fueron modificando diferentes variables del protocolo inicial hasta la obtención de resultados reproducibles.

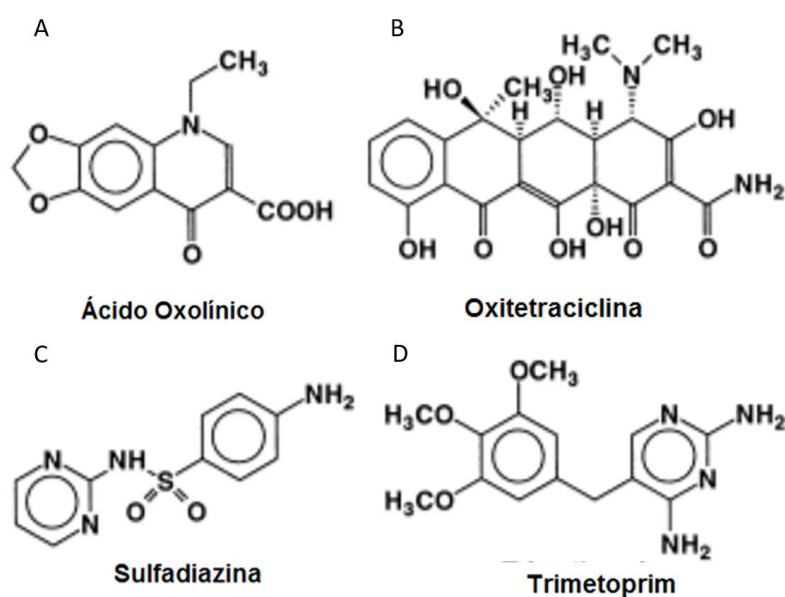


Figura 2.1: Fármacos utilizados para la optimización del protocolo. A, ácido oxolínico (AO). B, oxitetraciclina (OT). C, sulfadiazina (SD). D, Trimetoprim (TR).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

Puesta a punto de un protocolo de medida espectrofotométría de ecotoxicidad en algas *S. capricornutum* por microtitulaciones

3.2 Objetivos específicos

Aprendizaje de una técnica de ecotoxicidad

Aprendizaje de manejo de microalgas

Análisis de resultados y propuesta de modificaciones para la optimización del método

Tratamiento matemático y estadístico de datos de crecimiento e inhibición del mismo mediante el programa informático GraphPad Prism.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Especie

El test de ecotoxicidad se realizó sobre el alga unicelular de aguas dulces, *Selenastrum capricornutum*. Los rosarios de las mismas, fueron proporcionados por el kit ALGALTOXKIT F™ CONTINENTAL de ECOTEST, Valencia, España.

4.2 Preparación del Medio de Cultivo

El Medio de Cultivo para las algas se elaboró según dicta el protocolo OECD 201, mediante los diferentes viales “Nutrient Stock A, B, C y D” del kit ALGALTOXKIT F™ CONTINENTAL, proporcionado por ECOTEST. Así mismo, para la preparación del Medio se utilizó agua destilada mediante el sistema SIEMENS SG Series Compact. El pH final del susodicho se encontraba a 8,0 ± 0,1, el cual se midió gracias al pHímetro Crison Modelo 50-12T con electrodo de vidrio.

4.3 Desinmovilización de las algas

Se procedió a la desinmovilización de *S. capricornutum* de la roseta, según dictamina la OECD 201, mediante el uso del “Matrix Dissolving Medium” proporcionado por el kit ALGALTOXKIT F™ CONTINENTAL, y dos centrifugaciones sucesivas a 3000 rpm durante 10 minutos, intercaladas por lavado con agua desionizada. Para dicho proceso fue utilizada una Centrífuga de cabeza oscilante Multi Bas, Modelo 2750, Fabricante NaHita. El pellet final se resuspendió en 10 ml de medio de cultivo.

4.4 Preparación del inóculo de algas concentrado

La disolución algal se llevó a 25 ml por la adición de medio de cultivo y se procedió a la lectura de la densidad óptica de la misma a 670 nm gracias a un Espectrómetro visible JENWAY, Modelo 6300. Para ello, se utilizaron cubetas de 25 ml y medio de cultivo como blanco.

La concentración de algas se calculó gracias a la recta de calibrado proporcionada por el propio kit de *S. capricornutum* (Figura 1) y se preparó una disolución a 10⁶ céls/ml, como indica el protocolo actual.

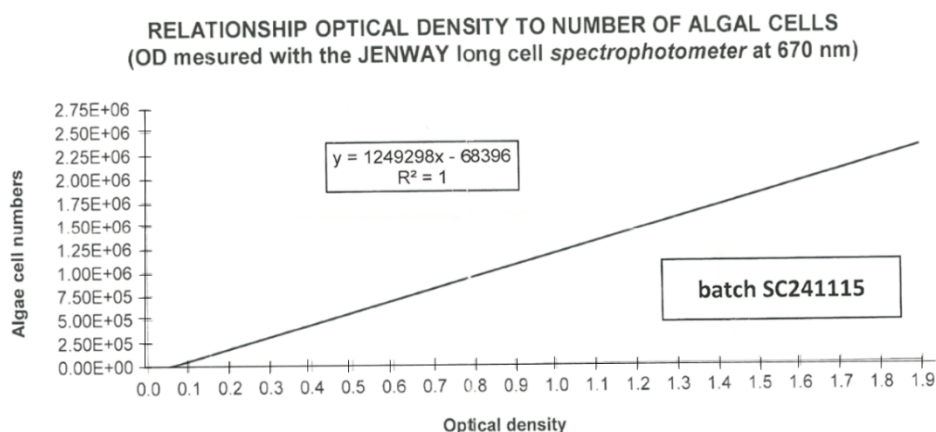


Figura 1: Relación Gráfica y Empírica entre Densidad Óptica y Concentración Celular de *Selenastrum capricornutum*

4.5 Preparación de las diluciones seriadas

Los compuestos (pureza, %) utilizados como sustancias tóxicas y las entidades de las cuales se obtuvieron, fueron los citados a continuación: Sulfadiazine (99%) y Oxolinic Acid (98%) de Alfa Aesar, Karlsruhe, Alemania; Oxytetracycline (91-94%) de Molekula, New Castle, Reino Unido; Trimethoprim (>99,8%) de Glentham Life Science, Wiltshire, Reino Unido. Todos los fármacos fueron administrados por el proveedor CYMIT QUIMICA.

Se prepararon disoluciones madre de los cuatro antibióticos en 50 ml de medio de cultivo en Vitrina de Gases FORMIMETAL, modelo NUBLAR 1300, debido a los posibles riesgos que la utilización de los mismos puede acarrear. A partir de las madre y en tubos Falcon de 15 ml, se realizaron para cada fármaco las diluciones seriadas correspondientes para obtener seis concentraciones a testar, siguiendo progresiones geométricas. (Las concentraciones utilizadas se muestran en la Tabla 5.1).

4.6 Transferencia de las soluciones a testar

Contrariamente a como indica el protocolo OECD 201, por el cual las diluciones seriadas se llevan a cabo añadiendo en ellas las algas para transferir el preparado a cubetas de 25 ml, se inocularon algas y diluciones directamente en los pocillos de las placas de 96. De esta manera conseguimos por un lado ahorrar volumen del preparado de células, añadiendo únicamente el necesario y por otro y más primordial, disminuimos el estrés ejercido sobre las algas, las cuales pueden sufrir rotura de membrana al pipetearlas repetidamente.

Cada fármaco se dispuso en una placa de 96 pocillos, dejando los pocillos externos rellenos con agua destilada para evitar la evaporación (filas A y H, columnas 1 y 12). De esta manera, se disponían de 60 pocillos por placa para desarrollar los test, de los cuales 36 correspondían a las diferentes concentraciones (6) y sus réplicas (6), mientras que los restantes se utilizaron como control negativo. Una quinta placa se utilizó solamente como control negativo.

El volumen total inoculado en cada pocillo fue de 250 µL. La concentración algal final en cada uno fue de $2,8 (\pm 0,1) \cdot 10^5$ céls/ml (se tomaron 70 µL del cultivo de algas y 180 µL de la disolución a testar o de medio de cultivo en caso de tratarse de un control negativo).

4.7 Incubación

Las placas fueron incubadas durante 72 horas con tapa a $21,5 \pm 1^\circ\text{C}$ (temperatura recomendada por el protocolo actual: $21-25^\circ\text{C}$) en un incubador refrigerado CLIMAS LAB Modelo CIR-DBO/180 N° Serie 7458.

4.8 Adquisición de resultados

Desde el momento en que se prepararon las placas y cada 24 horas hasta las 72 finales, se tomaron medidas de la densidad óptica de las diferentes soluciones a 670 nm. Esto en vez de procederse mediante un espectrofotómetro de cubetas de 10 cm, se llevó a cabo mediante el lector de placas SPECTRO star Nano, BMG LABTECH, modelo BL-3100. Para tomar esta medida en caso de realizarse según el protocolo vigente, la cubeta de 10 cm ha de ser agitada para su ulterior medida; mientras que en nuestro caso, se midió de manera directa la absorbancia gracias al lector. Solamente a las 72 horas se procedió a resuspender los pocillos previamente a tomar la medida de los mismos.

4.9 Tratamiento de datos

Los resultados del bioensayo de toxicidad algal se cuantificaron en términos de tasa de crecimiento a partir de los datos de DO obtenidos. Para ello se calculó el crecimiento de cada pocillo (Ecuación 1):

$$\text{Ecuación (1): } \Delta Abs_{i,j} = Abs_{72} - Abs_0$$

Donde $\Delta Abs_{i,j}$ es el crecimiento para la concentración i del fármaco y la réplica j , Abs_{72} es la medida de absorbancia a las 72 horas para el pocillo en cuestión, y Abs_0 es la medida de absorbancia del mismo pocillo a las 0 horas (tras la preparación del ensayo y antes de dejar las placas incubando).

Para cada concentración i se estimó la tasa de crecimiento μ_i mediante el promedio del crecimiento de cada réplica ($\Delta Abs_{i,j}$). Valores $\Delta Abs_{i,j}$ considerados claramente erróneos, se marcaron como *outliers* y no fueron incluidos en el posterior análisis estadístico.

De la misma manera se procedió con las muestras control c , calculando $\Delta Abs_{c,j}$ y μ_c .

La inhibición del crecimiento, I , se calculó a partir de la tasa de crecimiento relativa mediante la Ecuación (2):

$$\text{Ecuación (2): } I_i = (1 - \mu_i/\mu_c) \cdot 100$$

Donde I_i es la inhibición de crecimiento para el fármaco i expresada en porcentaje, μ_i es la tasa de crecimiento para la concentración i , y μ_c es la tasa de crecimiento del control [9].

Mediante el programa estadístico GraphPad Prism se integraron los porcentajes de inhibición I_i obtenidos para cada concentración junto con el logaritmo de la misma, $\text{Log } c$. Gracias al programa, que utiliza ecuaciones de regresión no lineal de dosis respuesta específicas para casos de inhibición, se obtuvieron los valores EC_{50} y sus correspondientes intervalos de confianza para cada uno de los cuatro fármacos, así como la ilustración gráfica de la inhibición del crecimiento (Figura 5.10 y Tabla 5.1).

Ensayos con coeficientes de determinación R^2 bajos o curvas inhibitorias alejadas de la forma sigmoidea característica, fueron considerados erróneos y sometidos a análisis para la modificación del procedimiento a llevar a cabo durante el siguiente ensayo.

4.10 Variables

Durante la puesta a punto del protocolo por microtitulaciones se fueron analizando diferentes variables y las opciones que de éstas surgían se establecían como características del proceso optimizado o se descartaban según se obtuvieran o no curvas de inhibición y coeficientes de determinación válidos. De esta manera se fue perfilando el protocolo hasta obtener resultados reproducibles.

Las variables estudiadas fueron: la densidad algal inicial, la incubación de las placas con o sin agitación, la resuspensión de los pocillos previa a la medida de su DO, el número de controles negativos, las micropipetas utilizadas, el orden de inoculación, la evaporación y condensación de pocillos, la disolución de los fármacos y la posición en el incubador.

En la Tabla 2 se recogen las diferencias del procedimiento optimizado por microtitulaciones con respecto al protocolo OECD 201.

Variable	Protocolo Actual	Microtitulación
Ensayos/vial	2	9
Concentraciones	3 – 6	5 – 7
Réplicas	0 – 3	5 – 7
Controles Negativos	3 – 6	6 – 24 (placa fármaco) + 60 (placa control)
Recipiente disoluciones	Cubetas de 25 ml	Placas de 96 pocillos
Recipientes Fármaco	3 – 18 fármacos + 3 – 6 control	1 placa fármaco + 1 placa control
Volumen Muestra	25 ml	250 μ L
Medición DO (670 nm)	Espectrofotómetro visible	Lector de placas
Tiempo medida DO/fármaco	15 – 60 min	10 – 15 min
Agitación durante medida DO	Siempre	Sólo a las 72 h
Preparación de un blanco	Siempre	No; presente en la propia placa

Tabla 4.1: Diferencias entre protocolo actual y optimizado

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se muestran a continuación los resultados obtenidos para las diferentes variables.

5.1 Agitación durante el ensayo

Tras realizar réplicas de bioensayos de toxicidad de los fármacos elegidos sobre *S. capricornutum* incubadas con agitación a 280 rpm y sin agitación, se observó que en las primeras aparecía una alta evaporación y condensación de las diluciones inoculadas en los pocillos sobre las tapas de las placas. En la Figura 5.1 se observan las gráficas obtenidas para el análisis de datos y el cálculo de los respectivos valores EC_{50} comparando las muestras agitadas y no agitadas.

Observamos para las microalgas tratadas con OA y OT sin agitar, que sus gráficas correspondientes presentan la forma característica de curva sigmoidea, mientras que las muestras incubadas con agitación no tienen perfil definido.

En cuanto a los fármacos SD y TR en ambos casos (con y sin agitación) muestran una fracción de curva que aunque no nos permitiera decantarnos por una de las dos condiciones, al encontrarse más apaisadas las gráficas de las muestras agitadas y tras lo analizado respecto a los dos antibióticos anteriores, podríamos confirmar que agitar las muestras y la parcial y consecuente evaporación y condensación de las mismas, afecta a los resultados. Es por esto que se decidió descartar la agitación para el desarrollo de los posteriores ensayos.

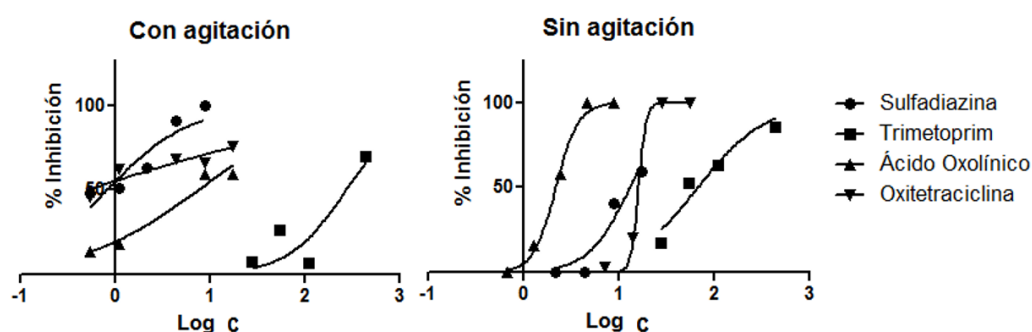


Figura 5.1: Gráficas comparativas de la Inhibición del Crecimiento Celular tras incubar, con y sin agitación, *S. capricornutum* durante 72 horas expuestas a los fármacos SD, TR, OA y OT.

5.2 Resuspensión

Tras tomar medidas espectrofotométricas de las placas pasadas 72 horas de incubación, los valores se compararon con los resultados obtenidos en caso de resuspender los mismos pocillos previamente a medir la DO.

Se observó que tras resuspender se obtenían gráficas de inhibición del crecimiento más coherentes y ajustadas a la curva sigmoidea ideal, como se muestra en la Figura 5.2A en la que incluso, aparecen valores obtenidos a partir de pocillos no resuspendidos que no podrían analizarse y deberían ser descartados (OA y OT). Es por ello que se determinó la necesidad de resuspender los pocillos previamente a su medición espectrofotométrica, sin embargo y al observar mediante microscopio óptico muestras de disoluciones una vez resuspendidas se estableció que únicamente se realizaría este paso de manera previa a la toma de absorbancias

tras las 72 horas de exposición a fármacos. Esto se debe, como se muestra en la Figura 5.2B, a que la resuspensión provocaba roturas de las paredes celulares y consecuente muerte de las algas, por lo que en caso de tomar las correspondientes medidas cada 24 horas resuspendiendo antes, se estaría afectando en gran medida a la viabilidad de las algas y en definitiva, interfiriendo en los resultados finales.

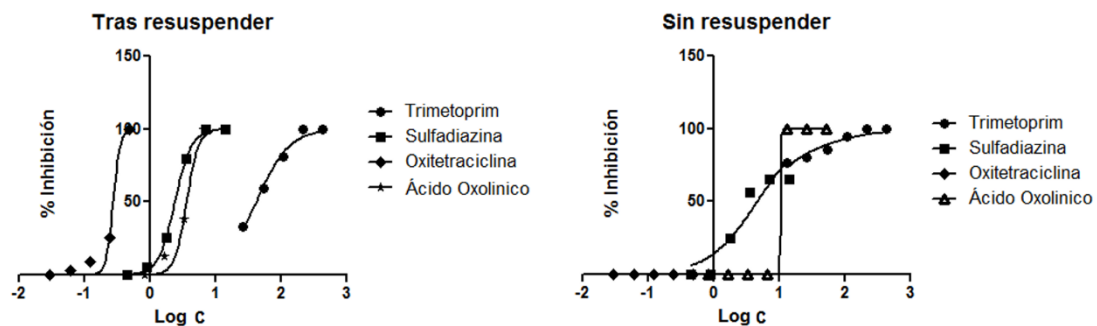


Figura 5.2A: Comparación gráfica de las tasas de crecimiento obtenidas mediante la medida de absorbancia tras 72 horas de incubación de algas expuestas a los fármacos AO, OT, SD y TR, con resuspensión previa a la medida o sin ella.

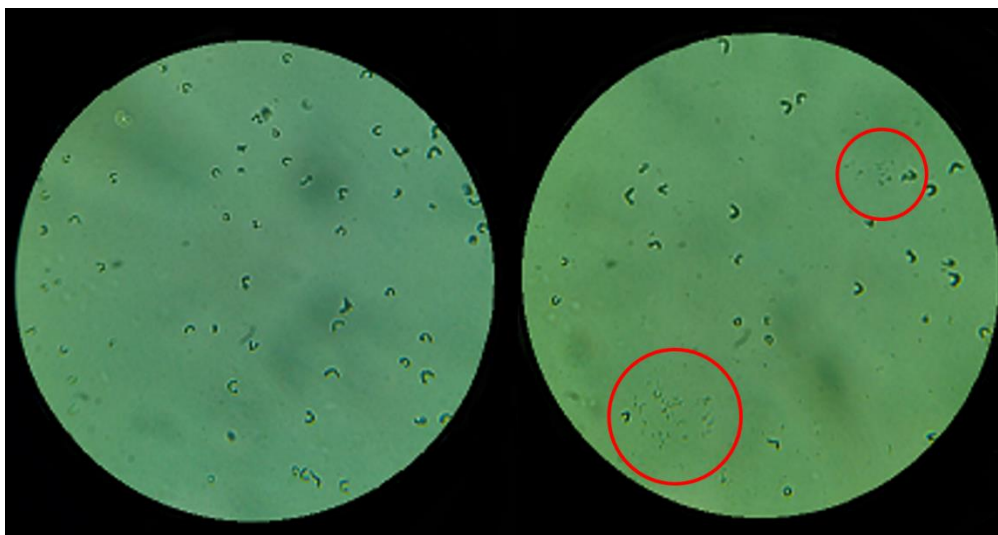


Figura 5.2B: Ambas imágenes corresponden a una muestra control negativo visualizada mediante microscopio óptico a 40 aumentos. En el caso de la derecha, el inóculo tomado del mismo pocillo ha sido previamente resuspendido. Aparecen rodeadas las zonas con restos celulares causados por el pipeteo.

5.3 Micropipetas

En relación a la ruptura celular por el estrés mecánico al que las algas se ven sometidas cuando se inoculan en las placas, se quiso averiguar si el uso de un tamaño de micropipeta u otro influía o no en la viabilidad de *S. capricornutum*. Para ello se preparó una microplaca de controles negativos (Figura 5.3 A) los cuales fueron inoculados, bien con pipetas de 100 μ l (casillas en color crema) o bien de 1000 μ l (casillas de color azul claro). Observando el incremento de absorbancia de los diferentes pocillos, los promedios y desviaciones estándar del crecimiento de los controles para ambos casos (Figura 5.3 B) resultaron prácticamente idénticas. De esta manera se puede

concluir que el uso de micropipetas de diferente tamaño no afecta a la viabilidad de las mismas, es decir, que el estrés mecánico al que se ven sometidas las algas es el mismo en ambos casos y no va a ser determinante el uso de una micropipeta u otra para la realización de los bioensayos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A	0,1565	0,1755	0,1835	0,1375	0,115	0,141	0,1425	0,1305	0,142	0,1365	0,1215	0,1315	\bar{x}	σ
B	0,2235	0,195	0,145	0,111	0,217	0,142	0,143	0,1605	0,4755	0,154	0,1005	0,114	0,1405	0,0314
C	0,121	0,1495	0,128	0,1565	0,138	0,1545	0,109	0,1155	0,1115	0,137	0,1635	0,159	0,1437	0,0314
D	0,1775	0,1485	0,1125	0,113	0,0985	0,1175	0,121	0,147	0,153	0,088	0,1145	0,224		

Figura 5.3: A, Tabla con los incrementos de absorbancia de controles negativos incubados durante 72 horas. Se muestran en azul los pocillos inoculados mediante micropipeta de 1000 μ l y en crema, los de 100 μ l. B, Promedio (\bar{x}) y desviación estándar (σ) de los valores de A, obviando el resaltado en rojo, que se considera outlier.

5.4 Concentración de algas

Se realizaron primeramente bioensayos a la concentración de algas indicada por el protocolo de la OECD 201: $c = 10^4$ céls/ml. Para un volumen total inoculado por pocillo de 250 μ l y teniendo en cuenta que según el protocolo vigente, las algas recién disueltas se han de preparar a una densidad celular de $c = 10^6$ céls/ml, debían de añadirse 2,5 μ l de disolución algal por pocillo. Ésta cantidad al ser tan pequeña puede dar lugar a errores por lo que se aumentó la concentración a inocular en las placas. Como se observa en la Figura 5.4, a densidades superiores de algas se obtienen gráficas sigmoideas más definidas.

Finalmente y para poder repartir la totalidad de algas resuspendidas a partir del vial comercial de manera que se disponga de mayor volumen para los controles negativos, necesidad que se explicará en el apartado 5.9, se estimó como concentración óptima: $2,8 \cdot 10^5$ céls/ml, que equivaldría a tomar 70 μ l de disolución algal madre.

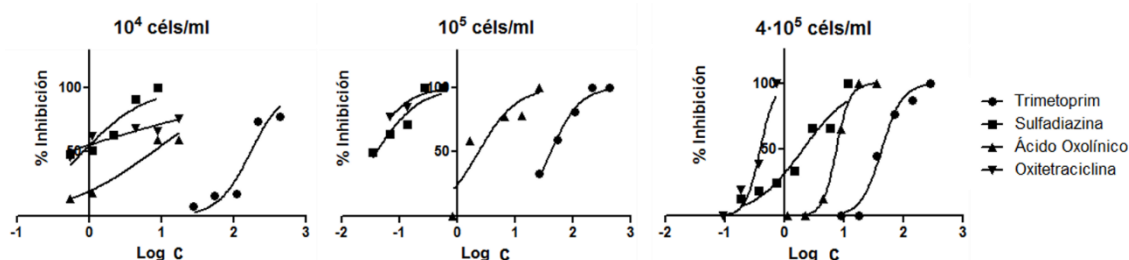


Figura 5.4: Gráficas comparativas de la Inhibición del Crecimiento Celular de *S. capricornutum* tras ser inoculadas a diferentes concentraciones e incubadas durante 72 horas expuestas a los fármacos SD, TR, OA y OT.

5.5 Orden de inoculación

Se procedió a la comparación del crecimiento algal en caso de inocular en primer lugar las algas en el pocillo y tras esto añadir la disolución a testar, bien de fármaco o bien de control (casillas blancas), en contraste con la adición de las células una vez el pozo contuviera el volumen adecuado de muestra (casillas grises). Atendiendo a los valores de crecimiento medio (\bar{x}) y desviación estándar (σ) (Figura 5.5 B) de los datos recogidos en la Figura 5.5 A, se muestra una gran similitud para ambos casos, lo cual dejaría a nuestro criterio el inocular en un orden u otro.

Sin embargo, los pocillos resaltados en amarillo corresponden con valores de crecimiento tras 72 horas de incubación negativos lo cual, tratándose de muestras control, entendemos que se debe a un error precisa y probablemente en la inoculación. Los cuatro casos pertenecen al conjunto de pocillos en los cuales las algas se añadieron en segundo lugar. Ésto nos lleva a pensar que procediendo en este orden, existe riesgo de que el inóculo se quede en las paredes del pocillo y/o no se homogeneíce correctamente impidiendo, como podemos intuir, el crecimiento de algas y por ende, provocando valores negativos o nulos. Dado que los volúmenes utilizados son incoloros y no sirven de ayuda a la hora de distinguir la correcta homogeneización de la mezcla, este problema se podría solventar resuspendiendo tras inocular para homogeneizar, lo cual como se ha comprobado en el apartado 5.2, no es conveniente ya que se favorecería la ruptura de la membrana celular y esto podría interferir en los resultados.

Por todo esto, entendemos que inocular primero las algas para después añadir la dilución, favorece la homogeneización y origina resultados más fiables, pese a que los valores promedio (\bar{x}^*) y desviación estándar (σ^*) corregidos (Figura 5.5C) puedan aparentar lo contrario, dada la mayor dispersión de medidas en los controles inoculados en primer lugar por las algas. Esto se explicará con detalle en el apartado 5.9.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,049	0,041	-0,004	0,014	0,045	0,065	-0,009	0,014	0,038	0,06	0,048	0,052	\bar{x}
B	0,061	0,043	0,026	0,039	0,064	0,075	0,028	0,049	0,022	0,04	0,06	0,068	σ
C	0,049	0,061	0,028	0,044	0,076	0,084	-0,015	0	0,042	0,019	0,059	0,044	0,0569
D	0,044	0,039	0,003	0,033	0,052	0,149	0,01	0,009	0,027	0,056	0,015	0,05	0,0323
E	0,028	0,039	0,025	0,049	0,067	0,088	0,071	0,104	0,091	0,118	0,101	0,085	\bar{x}^*
F	0,054	0,0584	0,063	0,074	0,057	0,07	0,056	0,0889	0,102	0,102	0,098	0,031	σ^*
G	0,069	0,084	0,048	0,041	0,063	0,066	0,081	0,089	0,093	0,134	0,115	0,078	0,0627
H	0,032	0,121	0,006	0,056	0,06	0,059	0,084	0,109	0,113	0,112	0,13	0,103	0,0586

Figura 5.5: A, Tabla con los incrementos de absorbancia de controles negativos incubados durante 72 horas. Se muestran en gris los pocillos inoculados primeramente con la dilución a testar, seguida de las algas y en blanco, los pocillos preparados en orden inverso. B, Promedio (\bar{x}) y desviación estándar (σ) de los valores de A, obviando el resaltado en rojo que se considera outlier. C, Promedio (\bar{x}^*) y desviación estándar (σ^*) de B corregidos: no se toman en cuenta los valores señalados en amarillo.

5.6 Evaporación de pocillos y condensación en la tapa

Durante el desarrollo de los bioensayos se observó una elevada evaporación en los pocillos externos de la placa. Por ello se decidió preparar las mismas, dejando las filas A y H y columnas 1 y 12 vacías.

Pese a la disminución de la evaporación de los pocillos con muestras más exteriores, ésta seguía ocurriendo por lo que se decidió añadir agua destilada en las filas y columnas recientemente citadas. Gracias a esto, se evitó de manera considerable la evaporación de los pocillos de interés. Así, las muestras inoculadas en cada microplaca seguían finalmente la disposición mostrada en la Figura 5.6.

Durante la repetición de los ensayos se fue observando además de la evaporación de los pocillos, la condensación de parte del volumen de los mismos en la tapa de las placas, de manera aparentemente más aleatoria que la evaporación ya que la disposición de agua destilada en los pocillos externos no consiguió la desaparición ni reducción de este fenómeno.

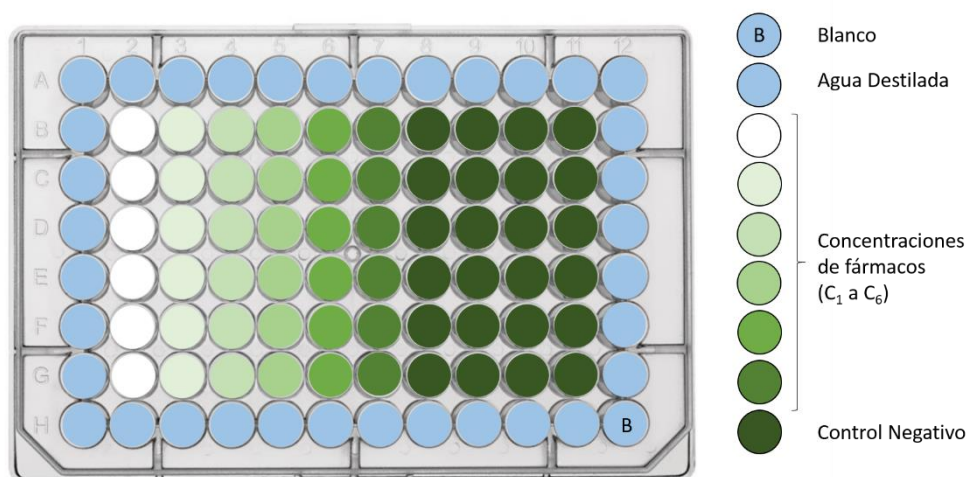


Figura 5.6: Disposición óptima de las muestras a inocular en una microplaca de bioensayos ecotoxicológicos.

Se intentó buscar solución al mismo, colocando un poco de papel a modo de cuña entre la placa y la tapa para que ésta quedara entreabierta y se permitiera la circulación de aire. No se observaron mejoras sino que seguía apareciendo condensación aparentemente al azar.

Finalmente se comprobó que, como se cita en el apartado posterior (apartado 5.7), al colocar las microplacas en la bandeja intermedia del incubador y no en la zona de alcance directo del refrigerador del mismo, se consiguió evitar tanto la evaporación como la condensación de los pocillos.

5.7 Posición en la incubación

Resultó un factor muy determinante en la optimización del protocolo la posición de las microplacas en el incubador; éstas se disponían al azar en una de las bandejas y tras la medida de absorbancias diarias de las mismas, se recolocaban de nuevo aleatoriamente.

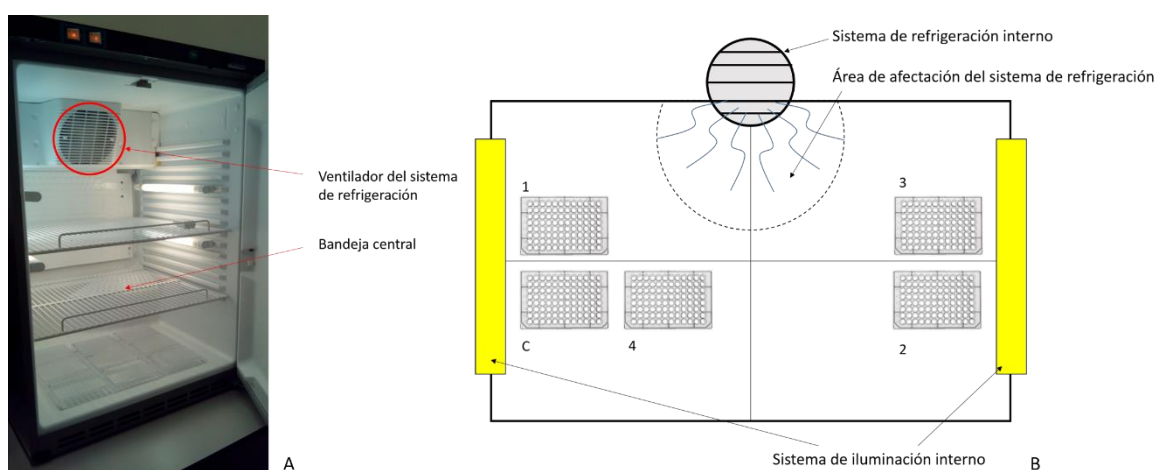


Figura 5.7: A, Incubador utilizado. B, Disposición de las placas en la bandeja intermedia. Cada 24 horas tras la medida de la absorbancia se recolocaban en la misma disposición pero cada placa en una posición y orientación distinta.

Se observó una relación directa de evaporación del contenido de los pocillos cuanto más cercana se encontrara la placa al sistema de ventilación del incubador. Esto llevó a evitar disponer las placas en la bandeja superior para colocarlas en la intermedia, disminuyendo considerablemente la evaporación.

Adicionalmente, situando las microplacas rehuendo el centro de la bandeja (el sistema de ventilación está orientado en el centro del incubador) dejaba de existir evaporación y condensación en todos los pocillos. Las Figuras 5.7 A y B ilustran las disposiciones finales.

5.8 Controles

Inicialmente se prepararon 12 controles negativos totales para los ensayos de los cuatro fármacos, y como se muestra en las Figura 5.8 A y B, la tasa de crecimiento de los mismos era verdaderamente heterogénea.

Esto se intentó solventar aumentando el número de controles negativos, para lo cual se introdujo una placa destinada íntegramente a pocillos control.

Esta medida no solucionó totalmente el problema ya que como podemos observar en las tres réplicas plasmadas en la figura 5.8C, existe gran variabilidad en los valores. Se ha pretendido mostrar en estos tres gráficos correspondientes a diferentes ensayos cómo en ocasiones se lograron valores control bien definidos (así ocurre en la réplica 3, que presenta una desviación estándar pequeña $\sigma = 0,0087$) y sin embargo también se obtuvieron casos de controles realmente dispares (la réplica 4 presenta una desviación estándar incluso superior al valor promedio del crecimiento de las algas control: $\bar{x} = 0,0326$ y $\sigma = 0,0390$). Otros no obstante, podríamos considerarlos “intermedios” (réplica 5, con una desviación estándar inferior 2,55 veces inferior a la proliferación celular media: $\bar{x} = 0,0625$ y $\sigma = 0,0245$).

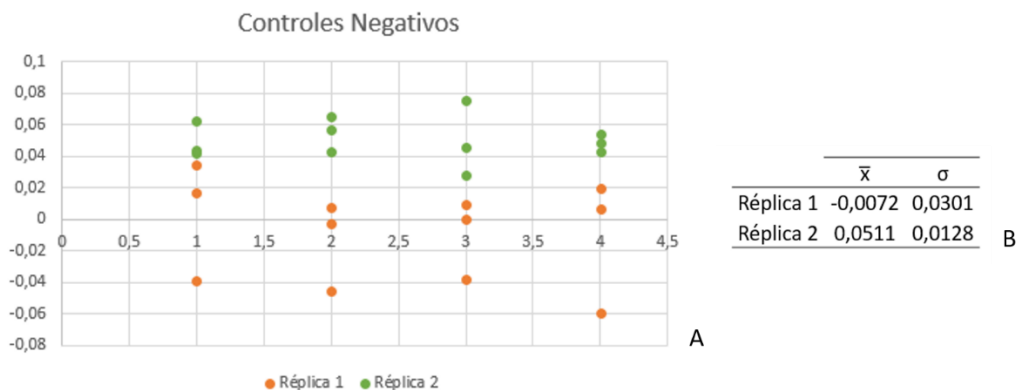


Figura 5.8: A, Representación gráfica de los valores control de dos réplicas de ensayos. B, Valores del crecimiento medio (\bar{x}) y la desviación estándar (σ) de las dos réplicas analizadas en A.

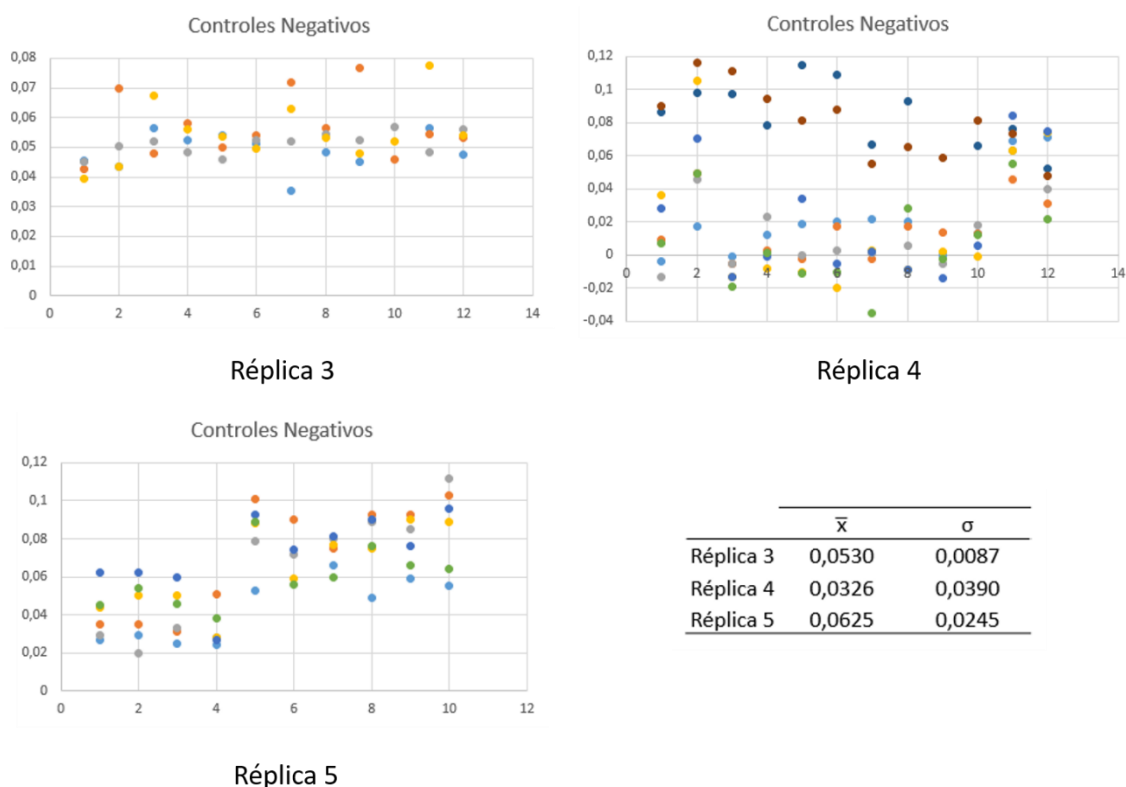


Figura 5.8C: Muestra gráfica de tres réplicas y sus valores de crecimiento, expresados en diferencia de absorbancia inicial y final. La tabla recoge los valores promedio plasmados en las gráficas (\bar{x}) y sus desviaciones estándar (σ).

Este factor ha supuesto un impedimento en la obtención de valores de EC_{50} similares a los bibliográficos ya que pese a obtener tasas de inhibición adecuadamente relacionadas en función de las concentraciones de fármaco utilizadas, la curva resultante se ha visto reiteradamente desplazada a lo largo del eje x (logaritmo de la concentración utilizada, Log c), modificando considerablemente la concentración media efectiva final.

5.9 Ensayos reproducibles

Finalmente se logró obtener resultados reproducibles, como se muestra en la Figura 5.9A.

En la Tabla 5.9A se señalan las concentraciones utilizadas en cada una de las réplicas, así como los resultados de concentración efectiva media (EC_{50}), los intervalos de confianza al 95% y el valor R^2 ; mientras que en la Tabla 5.9B se muestran los valores bibliográficos. Como se puede observar, éstos no se alcanzaron lo cual podemos suponer que se debe en gran parte a la dificultad de precisión al trabajar con volúmenes tan pequeños. Sin embargo, sí que se mantiene el orden de toxicidad: trimethoprim < sulfadiazina y ácido oxolínico < oxitetraciclina.

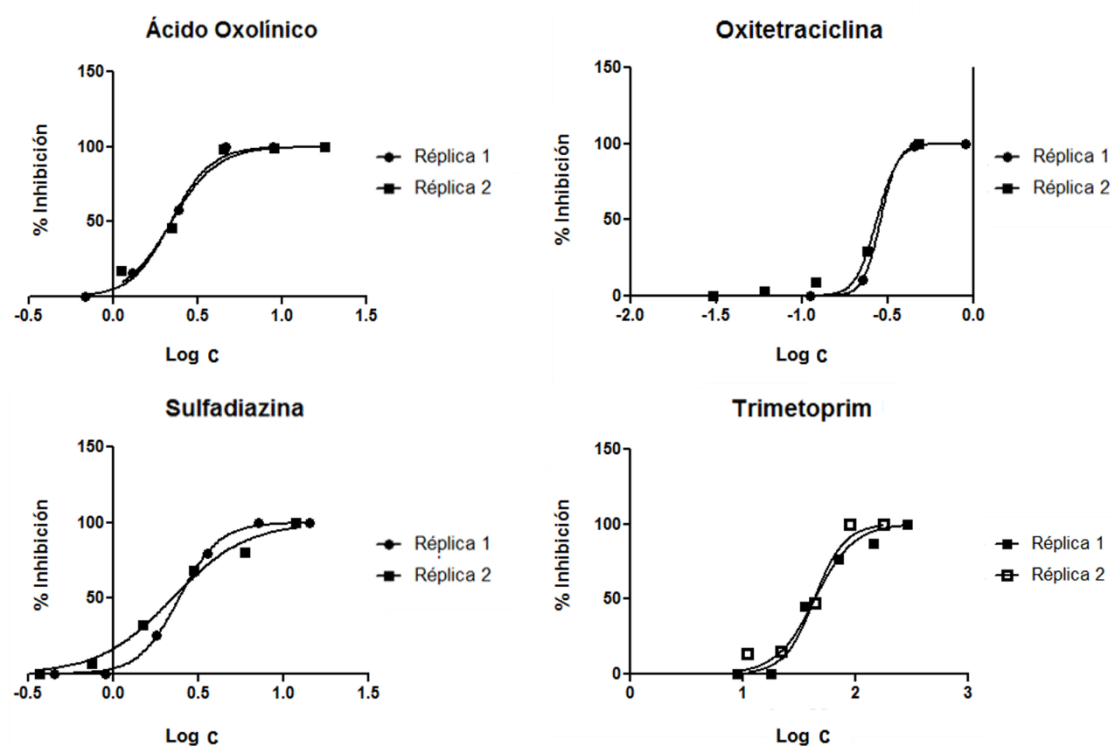


Figura 5.9A: Representación gráfica de la inhibición del crecimiento de *S. capricornutum* mediante la incubación durante 72 horas con los fármacos AO, OT, SD y TR. Se muestran dos réplicas de cada curva de crecimiento, demostrando la reproducibilidad del protocolo optimizado.

Réplicas	Concentraciones (mg/l)		EC ₅₀ (mg/l)		Intervalo Confianza 95%		R ²	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Ácido Oxolínico	0,53 – 16,95	1,13 – 36,03	2,204	2,222	1,924 – 2,525	1,738 – 2,840	0,9938	0,9755
Oxitetraciclina	0,06 – 0,45	0,03 – 0,49	0,2880	0,2739	0,2874 – 0,2885	0,2086 – 0,3597	1,000	0,9875
Sulfadiazina	0,45 – 14,41	0,37 – 11,97	2,437	2,225	2,313 – 2,569	1,833 – 2,701	0,9990	0,9888
Trimetoprim	18,08 – 289,2	11,16 – 178,56	43,69	43,23	33,68 – 56,68	30,59 – 61,09	0,9780	0,9614

Tabla 5.9A: Concentraciones finales utilizadas para la obtención de resultados reproducibles en la optimización del protocolo. Se disponen también las concentraciones de efectividad media (EC₅₀), los intervalos de confianza al 95% y los valores de R₂ obtenidos en las réplicas reproducidas.

	Concentraciones (mg/l)	EC ₅₀ (mg/l)	Intervalo Confianza 95%
Ácido Oxolínico	9,3 – 37	16	9,1 – 29
Oxitetraciclina	3,0 – 12	4,5	2,3 – 8,6
Sulfadiazina	3,0 – 27	7,8	4,5 – 14
Trimetoprim	30 – 270	130	81 – 211

Tabla 5.9B: Valores bibliográficos y de referencia de los cuatro fármacos utilizados para la optimización [2].

Analizando la optimización del protocolo llevada a cabo, podemos considerar dos puntos en los que puede radicar la disparidad de los resultados finales: Por un lado, la gran variabilidad obtenida en los controles negativos desplaza las curvas de inhibición a lo largo del eje x (Log c), siendo causantes directos del coeficiente de letalidad media. Por otro, teniendo en cuenta las condiciones en las que se desarrolló el bioensayo mediante el cual se obtuvieron los valores EC_{50} de referencia (protocolo ISO 8692), podemos hacer dos anotaciones:

1. En el estudio previo se analizaron 3 concentraciones de cada fármaco sin réplicas y el número de bioensayos fue de tres.

Esto influye en una mayor y contrastable amplitud del rango de valores EC_{50} para cada fármaco. Los datos bibliográficos pudieran no ser realmente precisos en tanto en cuanto se han realizado los cálculos basándose solamente en tres medidas, mientras que en nuestro ensayo, contábamos con 25 - 42 (entre réplicas y concentraciones).

Hemos de tener en cuenta que una curva sigmoidea como la que define la tasa de inhibición del crecimiento, requiere más de tres valores para poder formarse correctamente. Las obtenidas durante la optimización del protocolo, podemos observar (figura 5.9) que presentan entre 5 y 6 puntos determinantes de la forma de cada curva.

2. Los datos bibliográficos provienen de un bioensayo basado en el protocolo ISO 8692 modificado, que difiere a su vez de los pasos acatados durante esta optimización (se optimiza el protocolo OECD 201). Las siguientes diferencias procedimentales pueden considerarse como plausibles influencias en la disparidad entre los resultados:

- Incubación en matraces agitados (ISO 8692) y no en cubetas de 10 cm como dicta la OECD 201
- Medida del crecimiento e inhibición mediante determinación fluorométrica de la clorofila (longitud de onda de excitación de 430 nm y longitud de onda de emisión de 671 nm) que previamente se extrajo con etanol al 67 %
- pH de las diluciones a testar

Con respecto a este punto, y dado que en nuestro caso y siguiendo el protocolo actual, el pH se ajusta a $8,1 \pm 0,2$ en el momento de preparar el medio de cultivo y no en las diluciones con fármacos, se tomaron medidas de este parámetro en las disoluciones madre de cada uno de los antibióticos (Tabla 5.9C), permitiéndonos valorar variaciones del mismo en los cuatro casos, tres de acidificación y uno de alcalinización. Dado que las algas poseen un pH de crecimiento óptimo, probablemente este pH que finalmente estuvo en contacto con ellas, afectase a su viabilidad.

Fármaco	pH Disolución Madre
Ácido Oxolínico	7,5
Oxitetraciclina	7,20
Sulfadiazina	7,47
Trimetoprim	8,23

Tabla 5.9C: pH de las disoluciones madre de los fármacos

Este parámetro por tanto, sería de interés analizarlo con más detalle: desarrollar el protocolo microtitulado aquí optimizado con disoluciones de fármacos en las que se ajuste el pH a $8,1 \pm 0,2$ (pH al que finalmente se encontrará *S. capricornutum*).

- Inoculación de algas previamente propagadas durante 1 – 3 días

En la optimización se inocularon las algas resuspendidas directamente del vial comercial, como indica el protocolo base. Posiblemente dejar primero que éstas se propaguen durante al menos 24 horas (como realizaron según la ISO 8692) podría afectar positivamente a su viabilidad posterior en los pocillos de las placas ya que las células necesitan siempre de un periodo de adaptación que suele ocasionar descenso de la densidad celular. Esto de hecho se vio reflejado en diversas ocasiones en las que los controles a las 24 horas presentaban tasas de crecimiento negativas (Figura 5.9B).

Adicionalmente, sería posible que aquellas algas puestas en contacto directo tras obtenerse de la roseta con un fármaco disuelto en el medio, lo utilizaran como fuente de carbono en caso de encontrarse éste en concentraciones pequeñas y/o que adquirieran cierto grado de resistencia.

Por ello, ésta sería una variable a considerar para ensayos futuros: si las algas fueran inoculadas en las placas con sus correspondientes disoluciones (de fármaco o control) en fase de crecimiento exponencial (habiéndose dejado propagar durante 1 – 3 días y por ende, habiendo sufrido ya la fase de adaptación inicial), se encontrarían todas en las mismas condiciones frente a la presencia o no de sustancias tóxicas y sería posible que se obtuvieran tasas de crecimiento más homogéneas en los controles y con ello quizás valores de ecotoxicidad más cercanos a los de referencia (EC_{50} bibliográficos).

0,009	0,002	-0,016	-0,009	-0,01	0,05	-0,017	-0,004	0,005	0,004
0,019	0,005	0	0,016	-0,016	0,051	0,003	0,01	0,012	0,034
0,021	0,013	0,025	0,005	-0,02	-0,002	-0,008	0,004	0,005	0,005
0,019	0,016	0,017	0,01	-0,006	0,006	-0,011	-0,002	0,006	-0,01
0,018	0,02	0,023	0,019	-0,014	-0,008	-0,008	-0,013	-0,003	0,012
0,007	0,011	0,01	0,01	0,004	0,003	-0,01	-0,019	-0,003	0,001

Figura 5.9B: Tasas de crecimiento de una placa control tras 24 horas de incubación.

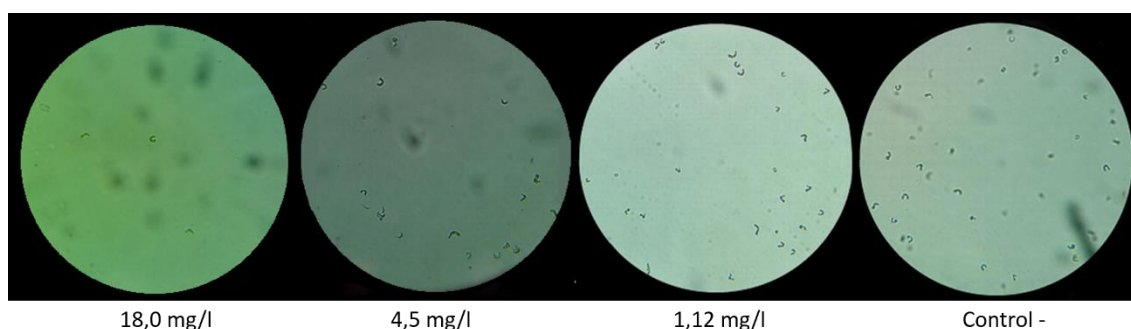


Figura 5.9C: Observación de muestras de cuatro pocillos correspondientes a un bioensayo de ecotoxicidad de ácido oxolínico sobre *S. capricornutum* al microscopio óptico de 100 aumentos.

5.10 Problemas en la disolución de los fármacos

Durante el desarrollo de la optimización se presentó un problema recurrente que podía afectar considerablemente los resultados obtenidos: la mala disolución de los fármacos al preparar las disoluciones madre.

Inicialmente éstas se preparaban en un volumen de 5 ml, y su resuspensión era realmente complicada. Pese a agitaciones vigorosas, los fármacos sedimentaban en cuanto dejaban de moverse los recipientes.

La primera medida para intentar solventar este problema fue pesar la mínima cantidad posible de fármaco para disminuir así el soluto a diluir.

Se propuso agitar estas disoluciones con micronúcleos y aunque se mejoraba la situación inicial, no se conseguía una buena disolución. Posteriormente se procedió al uso de ultrasonidos en vez de micronúcleos, obteniendo resultados similares a éstos.

La siguiente medida fue aumentar el volumen de las disoluciones madre a 50 ml, para ello se pesarían los fármacos en un vaso de precipitados tarado y seco, y se le añadiría medio de cultivo para solubilizarlos y verterlos en el matraz de la disolución inicial. Se repetiría varias veces para asegurar que no quedaran restos de la pesada del medicamento en el vaso. Además se determinó agitar los matraces con micronúcleos y de esta forma se consiguió una notable mejora en la disolución de los antibióticos aunque analizando los resultados (punto 5.9), se considera que éste podría ser un factor también influyente en la obtención de valores de ecotoxicidad inferiores a los bibliográficos.

6. CONCLUSIONES

Se ha conseguido obtener resultados reproducibles a través de la optimización por microtitulaciones de un protocolo de medida espectrofotométrica en algas *S. Capricornutum*.

Los valores obtenidos son menores a los bibliográficos, variando en un 66 – 94 % dependiendo del fármaco (Figura 6). Esta gran diferencia se atribuye presumiblemente a la fluctuación de las tasas de crecimiento de los controles negativos, que varían enormemente y a las diferencias existentes en el procedimiento llevado a cabo durante la optimización y en el ensayo de referencia.

	Optimización del protocolo OECD 201			Datos bibliográficos (Norma ISO 8692)	% Error
	EC ₅₀			EC ₅₀	
	Réplica 1	Réplica 2	\bar{x}		
Ácido oxolínico	2,204	2,222	2,213	16	86,17
Oxitetraciclina	0,288	0,274	0,281	4,5	93,76
Sulfadiazina	2,437	2,225	2,331	7,8	70,12
Trimetoprim	43,69	43,23	43,46	130	66,57

Figura 6: Porcentaje de error en los valores EC₅₀ obtenidos en comparación con los de referencia [2]

El protocolo optimizado por microtitulaciones para realizar ensayos espectrofotométricos de ecotoxicidad en algas *Selenastrum capricornutum* presenta finalmente las siguientes directrices:

(a) Los procesos de preparación del medio de cultivo y el inóculo de algas inicial resuspendido a partir de las rosetas se desarrollarán como indica el protocolo actual (OECD 201). Así mismo, la densidad celular inicial será como éste indica, de $c = 10^6$ céls/ml.

(b) Por el contrario, se verán modificados los siguientes aspectos:

El número de diluciones seriadas para cada fármaco será de 5 a 7.

El número de repeticiones de cada concentración será de 5 a 7.

Las diluciones de fármacos se prepararán en tubos Falcón de 14 ml (siendo el volumen de las mismas decidido en función del número de concentraciones y repeticiones).

Se inocularán un total de 250 μ l por pocillo en las placas microtituladoras de 96, de tal manera que la densidad celular del mismo sea de $c = 2,8 \cdot 10^5$ céls/ml.

En primer lugar se añadirá el volumen de algas correspondiente en el pocillo para posteriormente inocular la dilución a testar o medio de cultivo en caso de tratarse de un pocillo control.

La placa se inoculará dejando los pocillos externos (filas A y H, columnas 1 y 12) con agua destilada para evitar evaporación de muestras. Uno de esos pocillos externos deberá ser el blanco (250 μ l de medio de cultivo).

Se inocularán las muestras a testar de cada fármaco en una placa de 96, rellenando los pocillos restantes con controles negativos. Adicionalmente se preparará una placa exclusivamente para controles. (La disposición ideal de las diferentes muestras en cada placa se recoge esquemáticamente en la Figura 5.6).

Una vez preparadas las microplacas, se tomará medida de la absorbancia mediante espectrofotometría de manera directa, sin agitar la placa ni resuspender los pocillos. Así se procederá para las medidas a las 0, 24 y 48 horas de exposición a fármacos.

Se incubarán las placas disponiéndolas de manera aleatoria en una bandeja central y alejadas en la medida de lo posible del foco de corriente de aire del refrigerador (Figura 5.7).

La temperatura de exposición será de 21 ± 1 °C.

Pasadas 72 horas de incubación, se tomará la última medida tras resuspender uno a uno los pocillos. Preferentemente se resuspenderán y determinará la absorbancia de tres en tres filas para obtener datos más fiables.

Finalmente y como dicta la OECD 201, se integrarán los datos obtenidos para el cálculo de las concentraciones de letalidad EC_{50} y los intervalos de confianza.

CONCLUSIONS

Thanks of the optimization of a spectrophotometric measurement protocol used on algae *S. Capricornutum* via microtitulations, reproducible results have been achieved.

Obtained values are about 66-94% lower than bibliographic ones depending on the drug (Figure 6). This is presumably attributed to hugely fluctuating negative control growth rates and to the differences between the procedures carried out during both, optimization and the reference test.

The optimized protocol for an ecotoxicity spectrophotometric assay carried out on algae *Selenastrum capricornutum* by microtitulations finally presents the following guidelines:

(A) Culture medium and initial algae inoculum preparation procedures are settle down as indicated in the current protocol (OECD 201). Likewise and as it indicates, initial cell density will be $c = 10^6$ cells / ml.

(B) However, the following aspects will be modified:

The number of serial dilutions for each drug will be 5 to 7.

The number of replicates of each concentration will be 5 to 7.

Drugs dilutions will be prepared in 14 ml Falcon tubes (thereof volumes will be determined according to the number of replicates and concentrations).

Wells of 96 microtiter plates will be inoculated with 250 μ l of test dilution and a cell density of $c = 2,8 \cdot 10^5$ cells / ml.

Algae will be first added into the Wells. Drug dilution or culture medium (in case of preparing negative controls) will be added secondly.

The plate will be inoculated leaving the outer wells (rows A and H, columns 1 and 12) to be filled with distilled water to prevent evaporation of samples. One of these outer wells will be the blank (250 μ l of culture medium).

The samples to be tested for each drug will be inoculated on a 96 plate. The remaining wells will be filled with negative controls. In addition, a plate will be prepared exclusively for controls. (The ideal arrangement of the different samples on each plate is schematically showed in Figure 5.6).

Once microplates are prepared, absorbance will be measured by spectrophotometry without shaking the plate or resuspending any well. 0, 24 and 48 hours of exposure to drugs data will be estimated in this way.

The plates will be randomly laid out in a central tray while incubated. They will be as far as possible from the cool air current focus (Figure 5.7).

The exposure temperature will be 21 ± 1 ° C.

After 72 hours of incubation, absorbance will be measured after resuspending one by one the wells. For more reliable data, three rows will be preferably resuspended and measured at a time.

Finally, as dictated by the OECD 201, absorbance values data will be integrated in order to calculate the concentrations of lethality EC_{50} and the confidence intervals.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lanzky P.F., Halling-Sørensen B. (1997). "The toxic effect of the antibiotic metronidazole on aquatic organisms". *Chemosphere*, 35 (11), 2553-2561.
2. Holten Lützhøft H.-C., Halling-Sørensen B., Jørgensen S.E (1999). "Algal Toxicity of Antibacterial Agents Applied in Danish Fish Farming". *Environmental Contamination and Toxicology*, 36 (1), 1-6.
3. Berattini P. *Capítulo 8: Antibióticos en acuicultura*.
4. Halling-Sørensen B. (2000). "Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming". *Chemosphere*, 40 (7), 731-739.
5. Jones O.A.H, Voulvoulis N., Lester J.N. (2002). "Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals". *Water Research*, 36, 5013-5022
6. Jelic A.J., Petrovic M., Barceló D. (2012). "Pharmaceuticals in Drinking Water". En Barceló, D. (Coord.), *Emerging Organic Contaminants and Human Health* (pp. 47-49). Barcelona: Springer.
7. De la Torre, A.; Muñoz, M.J.; Carballo, M. (2004). *Curso sobre Toxicología Ambiental y Seguridad Química*. Sanidad Ambiental. CISA.
8. *Ensayos físico-químicos, toxicológicos y ecotoxicológicos. Métodos disponibles*. (s.d.). Eurofins BioPharma Product Testing Spain S.L.U. Parc Científic de Barcelona.
9. *OECD Guidelines for the testing of chemicals. Proposal for updating guideline 201. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test*. (2002). (s.d.).
10. Jurado E., Fernández-Serrano M., Núñez Olea J., Lechuga M., Jiménez J.L., Ríos F. (2010) "Acute Toxicity of Alkylpolyglucosides to *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* and Microalgae: A Comparative Study". *Bull Environ Contam Toxicol*. Doi: 10.1007/s00128-011-0479-5.
11. *Freshwater algae (Selenastrum capricornutum) Chronic toxicity test*. Niwa Ecotoxicology Laboratory (1998).
12. Andersen, R.A. (Coord.). (2005). *Algal Culturing Techniques*. China: Phycological Society of America, Elsevier Academic Press.
13. WikiPharma DataBase.

